

USSR

DESCRIPTION OF THE PATENT
for authors licensia

SU 1561261 A1

1.

- (21) Appl.No 4414627/28-14
(22) Filed: 25.04.88
(71) Assignee: Institute of Clinical Immunology
(72) Inventors: I.G. Tsyrova, I. A. Orlovskaia, E.B. Brosalina, E.N. Demchenko,
V.A. Koslov
(53) 615.373(088.8)
(56) B.I. Lord, I.G. Tsyrova, I. A. Orlovskaia, V.A. Koslov. Immunology 1987, 4,
14-20 / prototype /
(54) Purification process for stem cell proliferation inhibitor

2

(57) Abstract

This invention is related to medicine, particularly to the processes involved in the purification of bioactive compounds (BAC) from mammalian tissues. This goal of the invention is to increase the activity of BAC and to simplify the purification process from bone marrow cell extract.

The fraction of molecular weight 50-100 KD is separated on Amicon filters from the bone marrow cell extract. This fraction was separated by gel chromatography (Sephadex G-75), collecting the elution fraction with a molecular weight of 25 KD.

3.

Example

Bone marrow was obtained from the ribs of 10 half pigs and suspended to 2 liters of PBS. This was centrifuged at 2000 RPM for 20 minutes to eliminate bone marrow cells. The extract was passed through Amicon filters (XM-100 followed by PM-50), obtaining about 20 mg/ml of dry protein. The major component is albumin, according the electrophoretic analysis. Ammonium sulfate (40-80%) precipitation at 25° C resulted in a 20 fold increase in purity of BAC. Ion-exchange chromatography (DEAE-23 cellulose) elution was performed on a discontinuous gradient with sodium bicarbonate buffer (pH 6.0). Column volume 1.0 ml. Flow rate 4.0 ml/hour. Detection at 230 and 280 nm



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

10 06

F
ДЛЯ СЛУЖЕБНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКЗ. №

дз SU ш 1561261 A1

(51) 5 А 61 К 35/28

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НОМИТЕТ
ПО ИЗБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГННТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 4414627/28-14

(22) 25.04.88

(71) Институт клинической иммунологии СО АН СССР

(72) И.Г.Щирлова, И.А.Орловская,
Е.Б.Брасалника, Е.Н.Демченко

и В.А.Козлов

(53) 615.373(088.8)

(56) Б.И.Лорд, И.Г.Щирлова, И.А.Орловская, В.А.Козлов, Иммунология, 1987, № 4, с. 14-20.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИНГИБИТОРА ПРОЛIFЕРАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРОВИ

(57) Изобретение относится к области иммунологии, в частности к способам получения препаратов, ингибирующих пролиферацию стволовых клеток крови. Целью изобретения является повышение активности целевого продукта. Способ осуществляется посредством получения клеток костного мозга, выщелечения экстракта с мол. мас. 50-100 кд, осаждения сульфатом аммония, фракционирования ионообменной хроматографии и разделением гельфильтрацией, мол. мас. целевого продукта около 25 кд.

Изобретение относится к области медицины, а именно к способам получения иммуноактивных препаратов из костного мозга.

Целью изобретения является повышение активности целевого продукта.

Пример. Ребра свиньи полутуш зачищают от мышечных волокон и жира, режут на куски, гидропрессом, например марки "Биофизприбор", вымывают костный мозг. Центрифугированием при 2000 об/мин в течение 20 мин, удаляют (клетки костного мозга) КМ, а экстракт подвергают ультрафильтрации, через мембранны Amicon (США) последовательно РМ-50, ХМ-100. Полученный продукт содержит около 20 мг сухого вещества в 1 мл раствора. В соответствии с данными электрофоретического анализа его основным компонентом явля-

ется полученный продукт очищают, осаждая сульфатом аммония при 25°C насыщением 40-80%.

Полученный 20-кратной степенью очистки по общей массе биополимеров препарат фракционируют с помощью ионообменной хроматографии. Используют ДЭАЗ-23 целлюлозу, засыпку проводят ступенчатым градиентом натрийacetатного буфера рН 6,0.

Объем колонки 1 мл, скорость элюции 4 мл/ч. Детекцию проводят и при λ 230 и 280 нм на хроматографе "Милтихром". Выделяют фракцию, которая элируется в 5 мл натрийacetатном буфере, как обладающую наибольшей активностью.

Данные электрофореза показывают, что из этой фракции удалена основная белковая примесь - альбумин, что приводит к дополнительной 4-кратной очистке. Далее проводят фракционирование по молекулярной массе с помощь-

3

1561261

4

гельфильтрации, хроматографией на се-
фадексе G-75.

Объем колонки 20 мл (20x1), ско-
рость элюции 2 мл/ч. Элюцию проводят
ли в 50 мм NaCl, 10 мм трис-HCl,
рН 7,5). Детекцию проводят при λ 230
и 280 нм на хроматографе "Милликром".
Выделяют фракцию 5, как обладающую
наибольшей активностью.

Данные хроматографии и электрофо-
реза показывают, что полученное БАВ
очищено еще в 20-30 раз.

Активность целевого продукта оце-
нивали по ингибции пролиферации
стволовых клеток крови (СКК) методом
тимидинового самоубийства. При дозе
препарата $2 \cdot 10^{-2}$ мг пролиферация СКК
(число клеток в S-фазе цикла) снижа-
ется с 42,2% до 0 и следовательно ак-
тивность составляет 42,2%. Активность

препарата, полученного известным
способом, составляет 26,8%.

Ф о р м у л а з о б р е т е н и я

Способ получения ингибитора про-
лиферации стволовых клеток крови пу-
тем получения клеток костного мозга,
центрифугирования и ультрафильтрации
с выделением фракции с молекулярной
массой от 50 до 100 кД, отли-
чаящийся тем, что, с целью
повышения активности, выделенную
фракцию дополнительно осаждают 40-80%
сульфатом аммония и фракционируют и
исходя из хроматографией на ДЭАЗ-
цептилпиззе в ступенчатом градиенте нат-
рийацетатного буфера рН 6,0 с посте-
дущим разделением по молекулярному
весу с помощью гельфильтрации на
G-75-сефадексе.